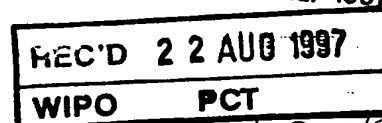


23 JUL. 1997



09/214759

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JUL. 1997

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

PRIORITY DOCUMENT

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **12 JUL 1996**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **96 08768**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **12 JUL 1996**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AINE

3, Avenue bugaud

75116 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

58689

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire



demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Al. spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis*, leurs procédés
d'obtention et leurs applications biologiques

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE

MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

101 rue de Tolbiac

75054 PARIS CEDEX 13

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Mandataire : Chantal PEAUCELLE

n° 92-1189

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

1295

CA



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 08768

TITRE DE L'INVENTION: ADN spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis*, leurs procédés d'obtention et leurs applications biologiques

LE (S) SOUSSIGNÉ (S) Madame PEAUCELLE Chantal

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

NASSIF Xavier
30 Rue Labrouste
75015 PARIS

TINSLEY Colin
156 Rue de VAugirard
75015 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 12 Juillet 1996

n° 92-1189

Chauvel

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
61 et 63			X	28.10.96	30 OCT. 1996 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

ADN spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis*, leurs procédés d'obtention et leurs applications biologiques.

L'invention est relative aux ADN spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis* (référéncées ci-après par Nm), à leur procédé d'obtention et à leurs applications biologiques, en particulier pour la prévention et la détection d'infections à méningocoques et de méningites.

On sait que Nm constitue l'un des principaux agents de la méningite cérébrospinale.

Des études menées aux Etats-Unis ont montré que de 5 à 10% de la population sont porteurs asymptomatiques de souche(s) de Nm. Les facteurs de transmission de Nm sont mal connus. Pour une proportion des personnes infectées, Nm pénètre le flux sanguin, où elle peut provoquer une méningococcémie et/ou progresse dans le flux cérébrospinal pour provoquer une méningite. Sans traitement antibiotique rapide, l'infection peut se développer de manière fulgurante et devenir mortelle.

Comparée aux autres pathogènes, Nm présente la caractéristique de pouvoir franchir la barrière hémato-encéphalique afin de coloniser les méninges. L'étude de la pathogénicité de Nm est donc non seulement importante dans le cadre de la méningite, mais aussi dans le cadre de toute maladie touchant le cerveau.

On conçoit donc l'intérêt de disposer d'outils spécifiques de cette espèce bactérienne pour les applications envisagées ci-dessus.

Nm est génétiquement, biochimiquement et antigéniquement très proche des bactéries de l'espèce *Neisseria gonorrhoeae* (référéncées ci-après par Ng) (homologie de 80 à 90% des séquences primaires d'ADN),
5 alors que ces deux bactéries expriment des pathogénicités très différentes.

En effet, Ng n'est responsable que d'inflammations localisées au niveau des muqueuses, généralement au
10 niveau de l'appareil urogénital. Contrairement à Nm, Ng ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique.

Nm et Ng sont donc deux bactéries très proches présentant des pouvoirs pathogènes très différents. Il
15 est clair que Nm présente des séquences d'ADN qui lui sont spécifiques et qui doivent intervenir au niveau de l'expression de son potentiel caractéristique d'invasion infectieuse.

20 L'espèce Nm est subdivisée en sérogroupes basés sur la nature des polysaccharides capsulaires.

Au moins 13 sérogroupes ont été définis, parmi lesquels les sérogroupes A, B et C sont responsables
25 d'environ 90% des cas de méningites. Les groupes A et C sont observés dans les formes épidémiques de la maladie. Le groupe B est le séro groupe le plus couramment isolé en Europe et aux Etats-Unis.

30 La capsule, présente chez Nm et absente chez Ng, a servi de base pour l'élaboration de vaccins anti-méningite méningococcique.

Les polysaccharides de la capsule de Nm ont été utilisés pour l'élaboration d'un vaccin qui s'est montré efficace pour prévenir chez les adultes la méningite provoquée par les méningocoques de sérogroupes A, C, W135 et Y.

Cependant, le polysaccharide de Nm groupe C s'est révélé faiblement immunogène chez les enfants de moins de deux ans, alors que le polysaccharide de Nm groupe B est non immunogène chez l'homme et partage des épitopes avec des glycoprotéines d'adhésion présentes dans les cellules neuronales humaines.

Il n'existe donc pas de vaccin universel capable de prévenir les infections provoquées par l'ensemble des sérogroupes des méningocoques et capable de répondre à la variabilité antigénique propre aux pathogènes bactériens en général et à Nm en particulier.

En raison de la réactivité croisée du polysaccharide groupe B de Nm avec les antigènes humain, de la multiplicité des sérogroupes et de la variabilité antigénique de Nm, les stratégies proposées à ce jour ne peuvent conduire à un vaccin efficace dans toutes les situations.

Les recherches se sont alors concentrées sur l'étude d'éléments caractéristiques responsables de la spécificité de la pathogénèse méningococcique.

La plupart des gènes qui ont été étudiés dans l'une quelconque des deux bactéries Nm ou Ng possèdent leur homologue dans la deuxième bactérie.

De la même manière, la plupart des facteurs de virulence jusqu'ici identifiés dans Nm ont une contrepartie dans Ng, c'est-à-dire la piline, les protéines PilC, les protéines d'opacité et les récepteurs de la lactoferrine et de la transferrine.

Les attributs spécifiques des méningocoques caractérisés dans l'art antérieur sont la capsule, les protéines Frp analogues aux toxines RTX, les protéines de la membrane externe Opc, la peroxydase glutathione, la porine PorA et le gène rotamase.

Parmi ceux-ci, seule la capsule est invariablement présente dans les souches virulentes de Nm. Cependant, de nombreux pathogènes extra-cellulaires possèdent une capsule sans pour autant traverser la barrière hémato-encéphalique.

Des attributs non encore identifiés doivent donc être responsables de la spécificité de la pathogénèse meningococcale. Ces attributs sont vraisemblablement encodés par des séquences d'ADN présentes parmi les méningocoques mais absentes chez les gonocoques.

Les inventeurs ont développé une nouvelle voie d'approche basée sur l'isolement soustractif des gènes Nm-spécifiques, ces gènes devant être liés à la pathogénèse spécifique de Nm, et, plus particulièrement au franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

La méthode soustractive développée dans l'art antérieur a abouti à la production de marqueurs

épidémiologiques pour certains isolats de Nm. Ces marqueurs sont d'une utilité limitée : ils ne couvrent pas l'ensemble des sérogroupes de l'espèce Nm.

5 Par contraste avec ces études, les travaux des inventeurs ont conduit, en confrontant Nm à l'ensemble du chromosome de Ng, cisailé de manière aléatoire, à la mise au point de moyens pour cloner l'ensemble des ADN présents chez Nm et absents chez Ng, fournissant ainsi
10 des outils de haute spécificité vis-à-vis de Nm et permettant ainsi de répondre pour la première fois à la variabilité génétique de l'espèce.

L'invention a donc pour but de fournir des ADN Nm-spécifiques et des moyens pour les obtenir, notamment en
15 élaborant des banques formées exclusivement de ces ADN Nm-spécifiques.

Elle vise également les produits dérivés de ces
20 séquences d'ADN.

L'invention vise également la mise à profit des caractères spécifique et exhaustif de ces banques pour élaborer des outils utilisables notamment en diagnostic,
25 thérapie et prévention.

Les ADN selon l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit d'ADN présents chez *Neisseria meningitidis*, mais absents chez *Neisseria gonorrhoeae*, à l'exception
30 des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule polysaccharidique, *frpA*, *frpC*, *opc*, *por A*, et rotamase.

Selon un aspect majeur, ces ADN sont spécifiques de *Neisseria meningitidis* et ce, en dépit de la variabilité génétique de cette espèce.

5 Plus particulièrement, les ADN Nm-spécifiques sont absents de *Neisseria lactamica* et de *Neisseria cinerea*.

De façon surprenante, la majorité des différences génétiques entre les souches de méningocoques et celles de gonocoques apparaissent regroupées en régions distinctes, qui correspondraient à des îlots de
10 pathogénécités comme précédemment décrit pour *E. coli* et *Y. pestis*.

Ainsi, dans une disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce qu'ils
15 comprennent une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491 entre *tufA* et *pilT*, ou région 1 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous réserve d'être
20 spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

Par "spécifique", on désigne dans la description et les revendications les séquences de nucléotides qui ne
25 s'hybrident qu'avec celles de Nm, dans des conditions d'hybridation données dans les exemples.

Dans la région 1, sont regroupés des gènes de la capsule de *Neisseria meningitidis*.

30 Des ADN de ce type présentent une séquence correspondant, pour tout ou partie, à SEQ ID N°9, 13, 22 ou 30, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins

20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une séquence capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

5

Dans une autre disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce qu'ils sont constitués par une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* 10 Z2491 entre *pilQ* et *λ740*, ou région 2 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous réserve d'être spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

15 Des ADN selon cette disposition présentent une séquence correspondant, pour tout ou partie, à SEQ ID N°1, 2, 4, 6, 7, 10, 15, 31 ou 34, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une 20 séquence capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

Dans encore une autre disposition préférée de l'invention, ces ADN sont également caractérisés en ce 25 qu'ils sont constitués par une ou plusieurs séquence(s), telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491 entre *argF* et *opaB*, ou région 3 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou les séquence(s) ci-dessus, sous 30 réserve d'être spécifique(s) de *Neisseria meningitidis*.

Des ADN selon cette disposition sont caractérisés en ce qu'ils présentent une séquence correspondant pour tout ou partie à SEQ ID N°8, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 32 ou 35, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou, présentent une séquence capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

10 Les régions 1, 2, 3, identifiées ci-dessus, présentent une forte proportion de séquences *Neisseria meningitidis* spécifiques, et entrent également dans le cadre de l'invention.

15 D'autres ADN représentatifs de la spécificité vis-à-vis de *Neisseria meningitidis* présentent une ou plusieurs séquences telle(s) que présente(s) sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* Z2491, mais ne font pas partie des régions 1, 2, 3 définies ci-dessus.

20 De tels ADN comprennent une ou plusieurs séquences correspondant pour tout ou partie à SEQ ID n°3, 5, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 27 ou 33, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou présentent une séquence capable de s'hybrider avec de telles séquences.

30 Compte tenu des applications particulièrement visées, l'invention concerne plus spécialement les ADN ci-dessus impliqués dans la pathogénèse de l'organisme bactérien.

Elle vise, en particulier, les ADN répondant à au moins l'une des caractérisations données ci-dessus, et codant pour une protéine exportée au-delà de la membrane cytoplasmique et/ou dont tout ou partie de leur séquence
5 correspond à la région conservée desdits ADN.

Selon d'autres dispositions, l'invention vise les vecteurs de transfert et d'expression, tels que plasmides, cosmides ou bactériophages, comportant au
10 moins un ADN tel que défini ci-dessus.

Elle vise aussi les cellules hôtes telles que transformées par au moins un ADN tel que défini ci-dessus.
15

D'autres cellules hôtes de l'invention comportent des gènes ou des fragments de gènes spécifiques de Nm et sont caractérisées en ce que leur chromosome est délété d'au moins un ADN selon l'invention, en particulier d'un
20 ADN responsable de la pathogénicité. Il s'agit plus spécialement de cellules bactériennes, notamment de Nm.

L'invention a également pour objet les ARN dont la séquence correspond pour tout ou partie à la
25 transcription d'au moins une séquence ou fragment de séquence d'ADN tel que défini ci-dessus.

Les acides nucléiques anti-sens des ADN tels que définis ci-dessus, ou de fragments de ces ADN, font
30 également partie de l'invention.

Ces acides nucléiques anti-sens portent le cas échéant au moins un substituant telle qu'un groupe méthyle et/ou un groupe glycosyle.

5 D'autres produits entrant dans le champ de l'invention sont constitués par des polypeptides.

Ces polypeptides sont caractérisés en ce qu'ils présentent un enchaînement d'acides aminés correspondant
10 à tout ou partie d'une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis dans ce qui précède, ou telle que déduite des séquences de ces acides nucléiques.

Il s'agit avantageusement de polypeptides
15 correspondant à tout ou partie de polypeptides exportés au-delà de la membrane cytoplasmique, plus spécialement de polypeptides correspondant à tout ou partie de ceux tels que codés par une région conservée.

20 En variante, les polypeptides de l'invention peuvent être modifiés par rapport à ceux correspondant aux séquences d'acides nucléiques, et ce de manière à être particulièrement adaptés pour une application donnée, en particulier une application vaccinale.

25

Par modification, on entend toute altération, déletion, substitution chimique, dès lors qu'elle n'affecte pas les propriétés biochimiques des polypeptides natifs correspondants.

30

D'autres produits conformes à l'invention sont constitués par les anticorps dirigés contre les polypeptides ci-dessus.

L'invention vise ainsi les anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent au moins un épitope d'un polypeptide
 5 tel qu'évoqué plus haut.

Elle vise également les fragments de ces anticorps, plus particulièrement les fragments Fv, Fab, Fab'2.

10 Les anti-anticorps capables de reconnaître les anticorps définis ci-dessus, ou leurs fragments, selon une réaction de type antigène-anticorps, font également partie de l'invention.

15 Conformément à l'invention, les différents produits considérés ci-dessus sont obtenus par voie de synthèse et/ou biologique en opérant selon les techniques classiques.

20 Les acides nucléiques peuvent être également obtenus à partir de banques constituées d'ADN Nm- spécifiques, telles qu'élaborées selon une technique soustractive, cette technique comprenant :

- 25 - le mélange de deux populations d'ADN,
 - la réalisation d'au moins une itération d'hybridation-amplification soustractive, et
 - la récupération du ou des ADN souhaités, suivie le cas échéant de leur purification avec
 30 l'élimination des séquences redondantes.

Conformément à l'invention, les deux populations d'ADN proviennent respectivement d'une souche de *Neisseria meningitidis*, dite souche de référence, pour

laquelle la banque spécifique doit être constituée, et d'une souche de *Neisseria gonorrhoeae*, dite souche de soustraction, présentant une homologie en séquences primaires d'ADN supérieure à environ 75% avec la souche de *Neisseria meningitidis*, les séquences d'ADN des souches de soustraction et de référence étant telles qu'obtenues respectivement par cisaillement aléatoire, et par clivage par une endonucléase de restriction capable de produire des fragments de taille inférieure à environ 1kb.

L'invention vise en particulier un procédé d'obtention de banques d'ADN *Neisseria meningitidis* spécifiques, comportant les étapes de :

- cisaillement aléatoire de l'ADN d'une souche *Neisseria gonorrhoeae*, dite souche de soustraction, notamment par passages répétés à travers une seringue,
- clivage de l'ADN d'une souche de *Neisseria meningitidis*, dite souche de référence, de préférence par une enzyme de restriction produisant des fragments de taille inférieure à 1kb environ,
- ligature des fragments d'ADN de la souche de référence, clivés par l'enzyme de restriction, avec des amorces oligonucléotidiques appropriées,
- réalisation d'une itération d'hybridation-amplification soustractive par :
 - . mélange des deux populations d'ADN dans des conditions appropriées pour l'hybridation des séquences homologues, puis
 - . amplification des fragments auto-réannelés et récupération de ces fragments,

. digestion de ces fragments par une enzyme de restriction, et re-ligature à des amorces oligonucléotides suivie d'une

- 5 - purification de l'ADN ligaturé, et le cas échéant, d'une nouvelle itération d'hybridation soustractive, comportant le mélange de fragments d'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* cisailé comme indiqué ci-dessus avec les fragments d'ADN de *Neisseria meningitidis* issus de l'itération précédente, suivi, si on le souhaite du
- 10 clonage des ADN de la banque.

Les amorces utilisées sont des amorces oligodésoxynucléotidiques adaptées à l'endonucléase de restriction utilisée et permettant une insertion dans un

15 site de clonage, tel que le site EcoRI du plasmide pBluescript. On choisira avantageusement de telles amorces parmi les oligodésoxynucléotides référencés dans le listing de séquence sous SEQ ID n°36 à 45.

20 Les banques ainsi obtenues sont formées d'ADN spécifiques des méningocoques et absents chez les gonocoques.

La spécificité des ADN a été vérifiée comme exposé dans les exemples, à chaque itération par Southern blots,

25 avec des gènes communs à la souche de soustraction et à la souche de référence, ou avec l'ADN total de chacune des souches digéré par une endonucléase de restriction, telle que ClaI.

30 A chaque itération, a également été vérifiée l'exhaustivité de la banque d'ADN par Southern blotting avec des sondes connues pour être spécifiques de la

souche de référence, à savoir pour *Neisseria meningitidis*, les gènes *frp*, *opc*, rotamase, notamment.

5 Les expériences réalisées ont montré que les banques obtenues selon le procédé de l'invention sont dépourvues des gènes présentant une homologie significative avec des espèces de *Neisseria* autre que *Neisseria meningitidis*, par exemple les gènes, *ppk* ou *pilC1*, et ce généralement, en seulement 2 ou 3 itérations.

10

Si nécessaire, deux voies, non exclusives l'une de l'autre, peuvent être empruntées.

Il est possible de procéder à une $(n+1)^{\text{ème}}$ itération, en utilisant l'ADN de l'itération n comme
15 population d'ADN de la souche de référence.

En variante, on réalise une deuxième banque, indépendante de la première, avec une enzyme de restriction de spécificité différente de celle utilisée dans la première banque, par exemple *MboI*.

20

Dans tous les cas, il est préférable de conserver chacun des produits issus de chacune des itérations réalisées.

25 Le procédé d'obtention de ces banques et les banques elles-mêmes font également partie de l'invention.

On observera que de manière générale ce procédé est applicable pour l'obtention de banques d'ADN spécifiques d'une espèce de cellule donnée ou d'un variant donné
30 d'une même espèce, dès lors qu'il existe une autre espèce ou un autre variant proche génomiquement et exprimant des pouvoirs pathogènes différents.

En appliquant le procédé de l'invention, on constituera avantageusement des banques d'ADN spécifiques d'espèces données de cryptocoques, d'*Haemophilus*, de
5 pneumocoques ou encore d'*Escherichia coli*, ou plus généralement de tout agent bactérien appartenant à la même espèce et disposant de pathovars différents.

De même, à partir de ces banques, l'invention
10 fournit les moyens de disposer de facteurs de virulence spécifiques d'une espèce ou d'un variant donné.

De telles banques constituent donc des outils présentant un intérêt majeur pour disposer d'attributs
15 responsables de la spécificité d'un pathogène, cette application étant plus spécialement illustrée conformément à l'invention par l'obtention de banques renfermant les attributs responsables de la spécificité de la pathogénèse méningococcique.

20 L'étude des produits de l'invention, acides nucléiques, polypeptides et anticorps, a permis de mettre en évidence une spécificité absolue vis-à-vis de *Neisseria meningitidis*, quelle que soit la souche et sa
25 variabilité.

Ces produits sont donc particulièrement appropriés pour le diagnostic ou la prévention des infections et méningites provoquées par *Neisseria meningitidis*, que ce
30 soit chez l'adulte ou l'enfant et quel que soit le séro groupe de la souche en cause.

La méthode de diagnostic, selon l'invention, d'une infection meningococcique, et plus particulièrement de la méningite meningococcique, par mise en évidence de la présence de *Neisseria meningitidis* dans un échantillon à analyser, est caractérisé par les étapes de :

- 5 - mise en contact, d'un échantillon à analyser, à savoir un échantillon biologique ou une culture cellulaire, avec un réactif élaboré à partir d'au moins un acide nucléique tel que défini ci-dessus, le cas
- 10 échéant sous forme de sonde nucléotidique ou d'amorce, ou en variante à partir d'au moins un anticorps, ou un fragment d'anticorps, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant respectivement une hybridation ou une réaction de type antigène-anticorps, et
- 15 - révélation du produit de réaction éventuellement formé.

Lorsque le réactif est élaboré à partir d'un acide nucléique, celui-ci peut se présenter sous forme de sonde nucléotidique dans laquelle l'acide nucléique, ou un

20 fragment de ce dernier, est marqué afin de permettre sa révélation. Des marqueurs appropriés comprennent des marqueurs radio-actifs, fluorescents, enzymatiques ou luminescents.

25 En variante, l'acide nucléique est inclus dans une cellule hôte, utilisée comme réactif.

Dans ces différentes formes, l'acide nucléique est utilisé tel quel ou sous forme d'une composition avec des

30 véhicules inertes.

Lorsque le réactif est élaboré à partir d'un anticorps, ou d'un fragment d'anticorps, celui-ci peut

être marqué aux fins de révélation. Le plus couramment, on utilise un marqueur fluorescent, enzymatique, radio-actif ou luminescent.

- 5 L'anticorps, ou le fragment d'anticorps utilisé, le cas échéant, marqué, peut être utilisé tel quel ou sous forme d'une composition avec des véhicules inertes.

- 10 L'échantillon utilisé dans l'étape de mise en contact est un échantillon biologique, issu d'un mammifère, tel que liquide céphalo-rachidien, urine, sang, salive.

- 15 L'étape de révélation est réalisée dans des conditions permettant de mettre en évidence le produit de réaction lorsqu'il s'est formé. Des moyens classiques mettent en oeuvre des réactions de fluorescence, luminescence, colorées, radio-actives ou encore des techniques d'autoradiographie. Il est également possible
20 de quantifier le produit.

- 25 Les produits marqués, acides nucléiques et anticorps font également partie en tant que produits nouveaux de l'invention.

- La méthode définie ci-dessus peut être appliquée au diagnostic d'une réaction immunitaire spécifique d'une infection méningococcique.

- 30 On utilise alors comme réactif un polypeptide conforme à l'invention, tel que codé par lesdites séquences d'acides nucléiques, correspondant au produit natif, ou un polypeptide modifié, mais possédant

l'activité biologique et immunologique de polypeptide natif correspondant.

5 Il s'agit avantageusement d'un polypeptide tel qu'exporté au-delà de la membrane cytoplasmique de *Neisseria meningitidis*, plus particulièrement de la partie d'un tel polypeptide correspondant à la région conservée de l'ADN.

10 L'invention vise également des kits pour la mise en oeuvre des méthodes définies ci-dessus. Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils comportent :

- au moins un réactif tel que défini ci-dessus, à savoir de type acide nucléique, anticorps ou polypeptide,
- 15 - les produits, notamment marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction d'hybridation nucléotidique ou de la réaction immunologique visée, ainsi qu'une notice d'utilisation.

20 La spécificité des produits de l'invention et leur localisation sur le chromosome de *Neisseria meningitidis* 22491 soit regroupés en région, pouvant être interprétées comme des îlots de pathogénécité, soit isolés sur le chromosome, leur confèrent un intérêt tout particulier pour la réalisation de compositions vaccinales à visée
25 universelle, c'est-à-dire quelque soit la souche et la variabilité qu'elle exprime. Ces compositions peuvent inclure dans leur spectre d'autres prophylaxies, et être, par exemple, associées aux vaccins de l'enfance.

30 L'invention vise donc des compositions vaccinales incluant dans leur spectre une prophylaxie à visée anti-méningococcique, destinées à prévenir toute infection susceptible d'être provoquée par *Neisseria meningitidis*,

ces compositions étant caractérisées en ce qu'elles comprennent, en association avec un ou des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace de polypeptides ou d'anti-anticorps ou de leurs fragments
 5 tels que définis ci-dessus, ces produits étant éventuellement conjugués, afin de renforcer leur immogénicité.

Des molécules immunogènes utilisables comprennent la
 10 protéine de polyovirus, la toxine tétanique, ou encore la protéine issue de la région hypervariable d'une piline.

En variante, les compositions vaccinales selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles
 15 comprennent, en association avec un/des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace :

- d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus,
- de cellules hôtes transformées telles que définies plus haut, ou
- 20 - de cellules de Nm dont le chromosome a été délété d'au moins une séquence d'ADN selon l'invention impliquée dans la pathogénicité de la bactérie. Le matériel nucléotidique utilisé est avantageusement placé sous le contrôle d'un promoteur favorisant son expression in vivo
- 25 et la synthèse de la protéine correspondante. Il est également possible afin de renforcer l'immunogénicité, d'associer ce matériel nucléique avec un ADN ou un ARN encodant une molécule porteuse telle que protéine de polyovirus, toxine tétanique, protéine issue de la région
- 30 hypervariable d'une piline.

Les compositions vaccinales de l'invention sont administrables par voie parentérale, sous-cutanée, intramusculaire ou encore sous forme de spray.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent afin d'illustrer celle-ci sans toutefois en limiter sa portée.

Dans ces exemples, il sera fait référence aux figures 1 à 3 qui représentent respectivement

- 10 - les figures 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F et 1G l'analyse de la banque soustractive Tsp5091,
- la figure 2, la distribution de séquences Nm-spécifiques sur le chromosome de la souche Z2491, et
- 15 - la figure 3A à 3C, la réactivité des clones des 3 régions du chromosome, selon l'invention, envers une panel de souches du genre *Neisseria*.

20 Dans les exemples qui vont suivre, les matériels et méthodes suivants ont été utilisés :

Souches bactériennes - Pour la réalisation des banques soustractives, la souche Z2491 de Nm (Achtman et al., 1991, *J. Infect. Dis.* 164, 375-382) et la souche MS11 de Ng (Swanson et al., 1974, *Infect. Immun.* 10, 633-644) ont été utilisées.

Afin de vérifier la spécificité de ces banques, 6 souches de Nm, 4 souches de Ng, une souche de N1 (20 *Neisseria lactamica*) et une souche de Nc (*Neisseria cinerea*) ont été utilisées.

Les six souches de Nm sont : Nm Z2491 de séro groupe A, Nm 8013 de séro groupe C (XN collection), Nm 1121 non séro groupable (XN collection), Nm 1912 séro groupe A (XN collection), Nm7972 de séro groupe A (XN collection) et Nm
5 8216 de séro groupe B (XN collection).

Les quatre souches de Ng sont : Ng MS11 (Institut Pasteur, Paris), Ng 403 (Institut Pasteur, Paris), Ng 6934 (Institut Pasteur, Paris) et Ng WI (isolée à partir d'une infection gonococcique disséminée).

10 La souche de Nl est Nl 8064 (XN collection) et celle de Nc, Nc 32165 (XN collection).

Techniques de génétique moléculaire

15 Sauf indication contraire, les techniques et réactifs utilisés correspondent à ceux recommandés par Sambrook et al (Sambrook et al 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les oligodésoxynucléotides utilisés dans cette étude sont les suivants :

20 RBam12, GATCCTCGGTGA;
RBam24, AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG;
JBam12, GATCCGTTTCATG;
JBAM24, ACCGACGTCGACTATCCATGAACG;
REco12, AATTCTCGGTGA;
25 REco24, AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG;
JEco12, AATTCGTTTCATG;
JEco24, ACCGACGTCGACTATCCATGAACG;
NEco12, AATTCTCCCTCG;
NEco24, AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG.

30

Transferts sur membranes (Southern blots)

Les transferts sur membranes ont été réalisés par transferts capillaires sur des membranes en nylon

chargées positivement (Boehringer Mannheim). Les hybridations ont été réalisées à 65°C dans une solution comprenant NaPi 0,5M pH7,2/EDTA 1mM/SDS 7%/ BSA 1%. Les lavages des membranes ont été réalisées dans une solution comprenant NaPi 40mM pH7,2/EDTA 1mM/SDS 1%. Le lavage final a été réalisé à 65°C pendant 5 min.

La sonde *frp*, obtenue avec des oligonucléotides basés sur la séquence de *frpA* correspond à 2,4 kb de l'extrémité 5' du gène de la souche Z2491. Les sondes *opc* et rotamase correspondant aux gènes entiers sont produites à partir de la souche Z2491 en utilisant des oligonucléotides réalisés sur la base de séquences publiées. Les sondes *pilC1* et *ppk* (polyphosphate kinase) correspondent aux inserts des plasmides pJL1 et pBluePPK6001, respectivement.

Exemple 1 : Réalisation de banques d'ADN présents chez Nm et absents chez Ng.

20 a. Banque "MboI"

Réalisation - L'ADN de Nm Z2491 a été clivé par l'endonucléase *MboI* et soumis à deux itérations d'une méthode, appelée ci-après CDA (Comprehensive Difference Analysis). Cette méthode comprend une hybridation soustractive en présence d'un excès d'ADN cisailé de Ng MS11 et une amplification par PCR de celles des séquences méningococciques qui, étant absentes de ou ne présentant pas d'homologie significative avec l'ADN de Ng MS11, pouvaient se ré-anneler.

L'ADN chromosomique de la souche Ng MS11 est cisailé de manière aléatoire par passages répétés à

travers une seringue hypodermique jusqu'à obtention de fragments dont la taille s'échelonne de 3 à 10 kb. Ces fragments d'ADN sont purifiés par extraction phénolique.

5 L'ADN chromosomique de la souche Nm Z2491 est, quant à lui, clivé par l'endonucléase de restriction *Mbo*I. Ces fragments d'ADN (20 µg) sont ligaturés à 10 nmoles des oligonucléotides annelés RBam12 et RBam24. Les amorces en excès sont éliminées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% à bas point de fusion. La partie du gel
10 contenant des fragments amplifiés de taille supérieure à 200 pb est excisée et digérée par la β -agarase. Ces fragments sont purifiés par extraction phénolique.

Afin de réaliser une hybridation soustractive
15 (première itération), 0,2 µg d'ADN Nm, ligaturé aux oligonucléotides RBam, est mélangé à 40 µg d'ADN Ng dans un volume total de 8 ml d'un tampon EE 3X (un tampon EE 1X est composé de N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(acide sulphonique propane 3) 10 mM et d'EDTA 1 mM, son pH est
20 de 8.0). Cette solution est recouverte d'huile minérale et l'ADN est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 2 min. 2 µl de NaCl 5M sont ajoutés et on laisse le mélange s'hybrider à 55°C pendant 48h. Le mélange réactionnel est dilué à 1/10 dans une solution préchauffée composée de
25 NaCl et de tampon EE, puis immédiatement placé sur de la glace.

10 µl de cette dilution sont ajoutés à 400 µl de mélange réactionnel pour PCR (Tris.HCl pH9.0 10mM; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Triton X100 0,1 %; 0,25 mM de chacun
30 des quatre désoxynucléotides triphosphate ; Taq polymérase 50 unités par ml). Le mélange est incubé pendant 3 min à 70°C pour compléter les extrémités des fragments ré-annelés d'ADN méningococciques.

Après dénaturation à 94°C pendant 5 min et addition de l'oligonucléotide RBam24 à raison de 0,1 nmole par 100 µl, les hydridations sont amplifiées par PCR (30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 70°C et 3 min à 72°C suivis par 1 min à 94°C et 10 min à 72°C; Perkin-Elmer GeneAmp 9600).

Les fragments méningococciques amplifiés sont séparés sur gel des amorces et des ADN gonococciques de hauts poids moléculaires. Ils sont digérés par *MboI* et de nouveaux oligonucléotides JBam12 et JBam24 leur sont ligaturés. Ces ADN ligaturés sont à nouveau purifiés sur gel et extraits au phénol.

Une seconde itération d'hybridation soustractive est réalisée sur 40 µg d'ADN Ng cisailé de manière aléatoire et 25 ng d'ADN ligaturé aux oligonucléotides JBam tel qu'obtenu à l'issue de la première itération d'hybridation soustractive. Lors de cette seconde itération, l'amplification de l'ADN Nm auto-annelé est réalisée à l'aide de l'oligonucléotide Jbam24.

20

Spécificité - Afin de confirmer leur Nm-spécificité, les séquences amplifiées après la seconde itération de la méthode CDA sont marquées et utilisées comme sonde pour de l'ADN digéré par *ClaI* issu d'un panel de six souches de *Neisseria meningitidis*, quatre de *Neisseria gonorrhoeae*, une de *Neisseria lactamica* et une de *Neisseria cinerea*.

Les Southern blots réalisés montrent que les séquences amplifiées à l'issue de la seconde itération de la méthode CDA présentent une forte réactivité avec de nombreuses bandes correspondant aux meningocoques et ne présentent pas de réactivité avec les bandes correspondant aux souches Ng, Nl, Nc.

30

La banque "MboI" apparaît donc comme Nm-spécifique.

Exhaustivité - Afin de tester l'exhaustivité de la banque, l'ensemble des produits issus de la première et de la seconde itérations de la méthode CDA ainsi que les matériaux chromosomiques initiaux de Nm Z2481 et de Ng MS11 sont soumis à électrophorèse sur gel d'agarose, transférés sur membrane et mis en contact avec des sondes comprenant des gènes connus pour être méningococcus-spécifiques, à savoir *frp*, *opc*, rotamase (Southern blot).

Il résulte de ces hybridations que le gène Nm-spécifique *frp* est représenté dans la banque MboI par un fragment de 600 pb, mais qu'aucune activité n'est observée pour les gènes rotamase et *opc*. La banque MboI, bien que Nm-spécifique, ne peut donc être considérée comme exhaustive.

Etant donné leur haute spécificité, les fragments issus de la seconde itération de la méthode CDA pour la banque MboI peuvent néanmoins être clonés sur le site BamHI du plasmide pBluescript.

Une séquence correspondant à un quelconque des gènes Nm-spécifiques ne peut être incluse dans la banque soustractive que si elle est portée par un fragment de restriction de taille appropriée. Cette condition est fonction de deux facteurs. Premièrement, la probabilité pour que les plus grands fragments soient entièrement Nm-spécifiques est faible. Deuxièmement, même si de tels fragments existaient, ils seraient sous-représentés dans la banque du fait des limitations de la technique PCR dont l'efficacité d'amplification diminue avec l'augmentation de la taille des fragments. Les fragments de taille supérieure à environ 600 pb ne sont pas inclus dans la banque. Du fait de l'absence, dans le chromosome

de Nm Z2491, de fragments *Mbo* de taille appropriée, les gènes *rotamase* et *opc* ne peuvent être inclus dans la banque. Une enzyme quelconque ne peut à elle seule produire un petit fragment correspondant à un gène Nm-
 5 spécifique quelconque. Une deuxième banque a donc été réalisée en utilisant une autre enzyme de restriction avec une spécificité différente : *Tsp509*.

b. Banque "*Tsp509I*"

10

Réalisation - L'enzyme *Tsp509I* présente l'avantage de produire des fragments de plus petite taille (inférieure à 1 kb environ) que l'enzyme *MboI*.

Tsp509I reconnaît la séquence AATT et laisse, en
 15 saillie en 5', une séquence de 4 bases compatible avec *EcoRI*. Les oligonucléotides utilisés sont Reco, Jeco et NECo.

La méthode suivie est conforme à celle suivie pour la réalisation de la banque "*MboI*" décrite ci-dessus. De
 20 plus fortes quantités d'ADN méningococciques ont cependant été utilisées pour la première itération d'hybridation soustractive afin de compenser le plus grand nombre de fragments de faibles poids moléculaires produits par *Tsp509I*. Pour la première itération, 400 ng
 25 de fragments d'ADN Nm et, dans la seconde, 25 ng de fragments Nm sont soumis à hybridation soustractive avec 40 µg d'ADN Ng cisailé de manière aléatoire.

Pour la réalisation de cette banque "*Tsp509I*", à titre de contrôle, une troisième itération d'hybridation
 30 soustractive est réalisée en utilisant 40 µg d'ADN Ng cisailé et 0,2 ng de fragments Nm résultant d'une digestion par *Tsp509I* et d'une re-ligature aux

adaptateurs NEco des fragments obtenus à l'issue de la seconde itération.

5 **Spécificité** - Comme décrit pour la banque précédente, le produit issu de la deuxième itération de la méthode CDA est marqué et utilisé comme sonde pour un panel de souches de *Neisseria*.

10 La figure 1A illustre l'hybridation Southern blot des produits de la seconde itération de la méthode CDA avec l'ADN digéré par *ClaI* de : Nm en piste a, de Ng MS11 en piste b, de Nm 8013 en piste c, de Ng 403 en piste d, de Nm 1121 en piste e, de Ng 6934 en piste f, de Nm 1912 en piste g, de Ng WI (souche DGI) en piste h, de Nm 7972 en piste i, de Nl 8064 en piste j, de Nc 32165 en piste
15 k, de Nm 8216 en piste l.

Contrairement à la forte réactivité observée avec toutes les souches Nm, une faible, ou aucune réactivité, est observée avec les souches Ng, Nl et Nc.

20 La spécificité de la banque a été étudiée plus avant en faisant réagir des transferts sur membrane (Southern blots) des produits issus de chacune des trois itérations de la méthode CDA avec des sondes correspondant à *pilC1* et *ppk*. Ces deux gènes sont communs à Nm et Ng.

25 La figure 1B représente un gel d'agarose après électrophorèse des chromosomes de Nm Z2491 et Ng MS11, digérés avec *Tsp509* et des produits issus de chacune des itérations de la méthode CDA.

30 En piste a, a été déposé 1 µg du chromosome de Nm, en piste b 1 µg de celui de Ng, en piste c 0,15 µg des produits issus de la première itération CDA, en piste d 0,1 µg de ceux de la seconde itération, en piste e 0,05 µg de la troisième itération, MW représentant les marqueurs de taille moléculaire.

Les figures 1C et 1D représentent des gels réalisés comme décrits en figure 1B après transfert sur membrane (Southern blots) et hybridation avec *pilC1* (figure 1C) et *ppk* (figure 1D).

- 5 A l'issue de la seconde itération de la méthode CDA, les séquences correspondant aux gènes *pilC1* et *ppk* sont complètement exclues de la banque.

10 Exhaustivité - L'exhaustivité de la banque a été examinée en faisant réagir les produits issus de l'hybridation soustractive avec des sondes correspondant à trois gènes Nm-spécifiques (*frp*, rotamase et *opc*).

 Ces sondes Nm-spécifiques réagissent avec les produits d'amplification issus de la première et de la
15 seconde itération d'hybridation soustractive.

 Les figures 1E, 1F et 1G représentent des gels réalisés comme décrits en figure 1B après transfert sur membrane (Southern blots) et hybridation avec *frpA* (figure 1E), rotamase (figure 1F) et *opc* (figure 1G).

- 20 Une troisième itération d'hybridation soustractive conduit cependant à la perte de séquences Nm-spécifiques car les fragments réagissant avec les gènes rotamase et *opc* sont absents de cette troisième itération.

25 En considérant l'ensemble de ces données, il résulte que les produits issus de la seconde itération de la méthode CDA sont Nm-spécifiques et constituent également une banque exhaustive des séquences Nm-spécifiques.

 Les produits issus de cette deuxième itération sont clonés au niveau du site *EcoRI* du plasmide pBluescript.

- 30 La banque produite par *Tsp509I* est plus exhaustive que la banque produite par *MboI*, comme les considérations théoriques basées sur la production

enzymatique de plus petits fragments de restriction le supposaient.

5 Selon cet aspect, il faut aussi noter que la banque *Tsp509I* est moins redondante que la banque *MboI* c'est-à-dire qu'elle comprend moins de duplication de clones. 86% des clones de la banque *Tsp509I* correspondent à des séquences distinctes alors que seulement 43% des clones correspondent à des séquences distinctes dans la banque *MboI* (données non présentées).

10 La banque produite par *Tsp509I* constitue donc une source de clones Nm-spécifiques.

Exemple 2 : Analyse des clones des banques soustractives

15 Clonage et séquençage des ADN Nm-spécifiques

Les ADN des banques soustractives sont clonés au niveau du site *BamHI* (banque *MboI*) ou *EcoRI* (banque *Tsp509I*) du plasmide pBluescript, puis transformés dans DH5 α de *E. coli*. Les inserts sont amplifiés par PCR
20 réalisée sur les colonies transformées en utilisant les amorces M13-50 et M13-40, cette dernière amorce étant biotinylée à son extrémité 5'.

Le séquençage a été réalisé sur chaque produit PCR après séparation des brins biotinylés et non-biotinylés
25 en utilisant le système Dynabeads M-280 à streptavidine (Dynal, Oslo). Les séquences sont criblées selon leurs homologues avec des séquences précédemment publiées en utilisant les programmes informatiques Blastn et Blastx (NCBI, USA et Fasta).

30 Les produits PCR issus des colonies de bactéries transformées, après utilisation des amorces M13-40 et M13-50 comme décrit ci-dessus, ont été marqués par

incorporation avec amorçage aléatoire de α -³²P-dCTP et ont été utilisés comme sonde pour les transferts sur membrane de l'ADN chromosomique digéré par ClaI des souches Nm Z2491 et Ng MS11, comme décrit ci-dessus afin de vérifier leur spécificité.

Cartographie des clones sur le chromosome de la souche Nm Z2491.

On rapporte les résultats des études effectuées avec 17 clones de la banque "MboI" (désignés par la lettre B) et 16 clones de la banque "Tsp5091" (désignés par la lettre E), chacun de ces clones présentant une séquence unique et sans contrepartie chez Ng.

Les positions des séquences d'ADN correspondant aux produits Nm-spécifiques clonés ont été déterminées par rapport à la carte publiée du chromosome de Nm Z2491 (Dempsey et al. 1995, J. Bacteriol. 177, 6390-6400) et à l'aide de transferts sur membranes (Southern blots) de gels d'agarose ayant été soumis à électrophorèse à champ pulsé (PFGE).

Les clones Nm-spécifiques sont utilisés comme sondes pour une hybridation sur membranes (Southern blots) de l'ADN de Nm Z2491 digéré avec des enzymes à rares sites de coupure, à savoir *PacI*, *PmeI*, *SgfI*, *BglIII*, *SpeI* *NheI* que *SgfI*.

Les gels (20 x 20 cm) étaient des gels à 1% d'agarose dans un tampon TBE 0,5X et ont été soumis à électrophorèse à 6 V/cm pendant 36 heures selon des périodes de pulsation variant de manière linéaire entre 5 et 35 secondes.

Les hybridations sur membrane (Southern blots) ont été réalisés comme décrit précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 2 : la réactivité a été localisée par comparaison avec les positions des fragments de taille correspondante sur la carte publiée. Les positions de l'ensemble des marqueurs génétiques cartographiés par Dempsey et al (précédemment cité) sont visualisées à l'aide de points sur la carte linéaire chromosomique. Les gènes Nm-spécifiques précédemment divulgués sont marqués d'un astérisque. Les deux loci appelés "*frp*" correspondent aux gènes *frpA* et *frpC*. Les locis "*pilC*" correspondent aux gènes *pilC1* et *pilC2* qui sont des paires de gènes homologues et qui ne sont pas distingués sur la carte. La précision des positions des clones Nm-spécifiques de l'invention dépend des chevauchements des fragments de restriction réactifs. En moyenne, la position est de +/- 20 kb.

Cette cartographie révèle une distribution non aléatoire des séquences Nm-spécifiques. La majorité des séquences Nm-spécifiques appartiennent à trois groupes distincts. Un de ces groupes (région 1) correspond à la position de gènes relatifs à la capsule précédemment décrits.

On distingue :

- E109, E138, B230 et B323 comme étant la région 1,
- B322, B220, B108, B132, B233, B328, E139, E145 et B101 comme étant la région 2, et
- B306, E114, E115, E124, E146, E120, E107, E137 et E142 comme étant la région 3.

63% des séquences identifiées comme spécifiques des méningocoques sont localisées à l'intérieur de ces trois régions distinctes.

Ce regroupement contraste avec la distribution de gènes Nm-spécifiques précédemment divulgués (*frpA*, *frpC*, *porA*, *opc* et la région relative à la capsule).

5 Cet art. antérieur suggérait en effet que les gènes Nm-spécifiques étaient à l'exception des gènes fonctionnellement relatifs à la capsule, dispersés le long du chromosome.

10 La cartographie des séquences Nm-spécifiques sur le chromosome conduit à un résultat inattendu en regard de l'art antérieur.

La majorité des différences génétiques entre les souches meningococcale et gonococcale testées sont regroupées en trois régions distinctes.

15 La région 1 regroupe des gènes relatifs à la capsule des meningococci.

La fonction des gènes des autres régions n'est pas connue mais des homologies avec des séquences publiées (tableau 1) suggèrent des similarités entre certains gènes de la région 3 et les protéines transposases et de 20 régulation de bactériophages. Aucun virus meningococcal n'a été caractérisé et il est tentant d'imaginer que ces séquences soient d'origine phagique. De manière intéressante, le génome de *H. influenzae* contient également une séquence homologue à celle de la protéine 25 de régulation Ner du phage Mu mais on ne sait pas s'il s'agit d'un gène fonctionnel.

Le clone B208 présente une forte homologie (48% d'identité, 91% d'homologie pour 33 acides aminés) avec un clone des régions conservées (domaine III) dans la 30 classe des protéines qui se lient aux sidérophores ferriques TonB-dépendants.

La proximité de ce clone avec les gènes Nm-spécifiques *porA* et les gènes régulés par le fer *frp*, et

en particulier la possibilité qu'il s'agisse d'une protéine récepteur Nm-spécifique exposée sur la membrane externe font de lui un bon candidat pour de plus amples recherches.

5 Le clone B339 correspond à la séquence d'insertion Nm-spécifique IS1106.

10 La faible homologie entre le clone B134 et la séquence d'insertion d'*Aeromonas*, ainsi que la présence en copies multiples du clone B134 parmi des souches variées de Nm, suggèrent qu'il pourrait représenter un nouveau type de séquence d'insertion Nm-spécifique.

15 La possibilité pour que les régions contenant les clones Nm-spécifiques puissent correspondre à des îlots de pathogénicité comme précédemment décrit pour *E. coli* et *Y. pestis* est d'un intérêt particulier.

20 Les clones isolés dans cette invention vont permettre de mieux comprendre la pertinence des régions Nm-spécifiques en permettant le clonage et le séquençage de fragments chromosomiques plus grands et directement par leur utilisation pour des mutations de loci.

25 Enfin, la détection des gènes meningococcus-spécifiques, éventuellement impliqués dans la pathogénicité de l'organisme, permet de cibler des antigènes appropriés utilisables dans un vaccin anti-meningococcique.

30 L'efficacité et la rapidité de la méthode selon l'invention permettent son utilisation dans un grand nombre de situations pour lesquelles les différences génétiques responsables d'un phénotype particulier à un de 2 pathogènes proches sont recherchées.

Etude de la réactivité des clones des régions 1, 2 et 3 vis-à-vis d'un panel de souches de *Neisseria*

Les produits PCR correspondant aux inserts de chacun des clones ont été rassemblés et utilisés comme sondes
5 d'hybridation sur membranes (Southern blots) pour un panel de souches de Nm, de Ng, de Nl et de Nc.

Les régions 1 et 2 produisent un nombre limité de bandes pour chacun des méningocoques. Cela suggère que ces régions sont à la fois Nm-spécifiques et communes à
10 tous les méningocoques.

La figure 3 illustre la réactivité des clones des régions 1, 2 et 3 envers un panel de souches neisseriales. Les clones des régions 1 (figure 3A), 2 (figure 3B) et 3 (figure 3C) pris ensemble ont été
15 utilisés comme sondes envers un panel de meningococci, gonococci et envers une souche de Nl et de Nc.

Les pistes sont les suivantes : ADN de Nm 22491 en piste a, de Ng MS11 en piste b, de Nm 8013, en piste c, de Ng 403 en piste d, de Nm 1121 en piste e, de Ng 6934
20 en piste f, de Nm 1912 en piste g, de Ng WI (souche DGI) en piste h, de Nm 7972 en piste i, de Nl 8064 en piste j, de Nc 32165 en piste k, de Nm 8216 en piste l.

De manière remarquable, la région 3 ne présente de réactivité qu'avec les meningococci de séro-groupe A.
25 Cette région 3 est donc spécifique d'un sous-groupe de Nm.

Une comparaison avec des séquences connues dans les banques de données a été réalisée afin d'évaluer les possibles fonctions des régions clonées.

30 Le tableau qui suit donne les positions des clones spécifiques sur la carte chromosomique et les homologues avec des séquences connues.

TABLÉAU - Position des clones spécifiques sur la carte chromosomique et homologies avec des séquences connues.

Nom du Clone*	Taille de l'insert	Fragments réactifs					Sgf	Position sur Z2491	Homologies des séquences protéiques
		Pac	Pme	Bgl	Spe	Nhe			
B305	259	18-20	15-17	22-23	18	11-13	2	λ736	
B333	235		15-17	22-23	18	11-13	2	λ736	
E109 ^{1,1}	211		6-7	11-15	10	11-13	2	<i>tuA/ctrA</i>	protéine LipB <i>N. meningitidis</i> (3 x 10 ⁻²⁶)
E138 ^{1,1}	315	1	6-7	11-15	10	11-13	2	<i>tuA/ctrA</i>	protéine LipB <i>N. meningitidis</i> (4 x 10 ⁻⁷⁵)
B230 ¹	356	1-3	6-7	1	10	11-13	2	<i>ctrA</i>	protéine KpsC <i>E. coli</i> (3x10 ⁻⁵³)
B323 ¹	363	1	6-7	1	10	11-13	2	<i>ctrA</i>	protéine CtrB <i>N. meningitidis</i> (2 x 10 ⁻⁶⁴)
B322 ²	210		2	16-18	6	1	5	<i>pilQ/λ740</i>	HlyB <i>S. marcescens</i> (4 x 10 ⁻¹⁵)
B220 ²	341		2	16-18	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
B108 ²	275		2	19-21	6	>18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
B132 ²	411	2	2	19-21	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
B233 ²	164	1-3	2	19-21	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
B328 ²	256	1-3	2	22-23	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
E139 ²	324	2	2	19-21	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
E145 ²	343	2	2	19-21	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
B101 ²	254	≥20	2	19-21	6	≥18	5	<i>pilQ/λ740</i>	
E103q	334		2	11-15	3-5	10	3	λ644	
B326 ⁸	314		2	11-15	3-4	10	3	λ644	
B326 (faible réactivité)			5	6	16	2	1	<i>argI</i>	
B342	167		2	19	3-4	6-7	3	<i>iga</i>	
E136	249		2	7	1	3	3	<i>lepA</i>	
B208	177		1	2	3-4	2	1	<i>porA</i>	récepteur de la pyochelaine FeIII <i>P.aeruginosa</i> (5.10 ⁻⁴)

B306 ^{3†}	219	11	5	11-12	5	2	4	parC
E114 ³	227	11	5	11-12	5	2	4	parC
E115 ^{3†}	251		5	11-15	5	2	4	parC
E124 ³	208		5	11-12	5	2	4	parC
E146 ³	146		5	11-15	5		4	parC
E120 ³	263		5	3-4	5	16	4	opaB
E107 ³	248	11	14-17	3-4	5	16	4	opaB
E137 ³	274		14-17	3-4	5	16	4	opaB
E142 ³	230		14-17	3-4	5	16	4	opaB
E116	379	5-7	11-13	3-4	2	6-7	8	λ375
B313	436	9	9	3-4	13-14	5	2	λ611
B341	201	8-10	9	3-4	13-14	5	2	λ611
E102	238		11-13	3-4	19	5	2	λ601
B134	428			multiple				
B339	259			multiple				

Transposase.
 Bacteriophage D3112
 (6×10^{-12})
 Protéine Ner-like.
H. influenzae (6×10^{-23})
 Protéine se liant à l'ADN
 Ner, Phage mu (3×10^{-18})

Protéine hypothétique
 H11730 *H. influenzae*
 (7×10^{-24})
 transposase ISAS2,
Aeromonas
salmonicida (5×10^{-5})
 transposase IS1106
N. meningitidis (6×10^{-45})

Entre parenthèses figure la signification des homologies trouvées, telle que donnée par le programme Blastx

*) Les clones marqués de l'exposant "1", "2" ou "3" appartiennent aux régions "1", "2" ou "3" respectivement du chromosome de *N. meningitidis* Z2491

+) E109 et E138 sont des clones contigus §) B306 et E115 se chevauchent †) B236 présente également une faible réactivité dans la région de *arg F*
 q) Le clone E103 contient un site *Tsp509 I* et peut donc contenir deux inserts, cependant, comme il ne réagit qu'avec un seul fragment *ClaI* (Oks) du chromosome de *N. meningitidis* Z2491 et n'occupe qu'une position sur la carte, ce clone est inclus ici.

On peut voir, tout d'abord, que les clones de la région 1 correspondent tous aux gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule. Ces gènes ont été précédemment étudiés parmi les Nm de séro groupe B (Frosch et al. 1989, 5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1669-1673 et Frosch et Muller 1993, Mol. Microbiol. 8 483-493).

A l'exception d'une faible homologie avec l'activateur de hémolysine de *Serratia marcescens*, les clones de la région 2 ne présentent aucune homologie 10 significative avec les séquences publiées, que ce soit au niveau de l'ADN ou des protéines.

Deux des clones de la région 3 présentent d'intéressantes homologies avec des protéines qui se 15 lient à l'ADN, en particulier les protéines de régulation et les protéines transposases de bacteriophages.

Le clone B208 présente une forte homologie avec une des régions conservées dans une classe de récepteurs (sidérophore ferrique TonB-dépendant).

Les clones B134 et B339 s'hybrident avec de 20 nombreuses régions du chromosome (au moins 5 et au moins 8, respectivement).

Les données concernant les séquences montrent que le clone B339 correspond à la séquence d'insertion Nm-spécifique S1106.

25 La traduction du clone B143 présente une homologie limitée avec la transposase d'une séquence d'insertion *Aeromonas* (SAS2) (Gustafson et al. 1994, J. Mol. Biol. 237, 452-463). Nous avons pu démontrer par transfert sur membrane (Southern blots) que ce clone est une entité Nm- 30 spécifique présente en multiples copies dans les chromosomes de chaque meningo coque du panel testé.

Les autres clones ne présentent pas d'homologie significative avec les séquences neisseriales publiées ni

d'ailleurs avec aucune séquence publiée. Ces clones constituent donc, avec la majorité des autres clones isolés, une banque de loci Nm-spécifiques totalement nouveaux.

5

Exemple 3 : Mise en évidence de la présence d'une ou plusieurs souches de *Neisseria meningitidis* dans un échantillon biologique.

10 Un échantillon biologique de type liquide céphalo-rachidien, urine, sang, salive est prélevé.

Après filtration et extraction, les ADN présents dans cet échantillon sont soumis à électrophorèse sur gel et transférés sur membrane par Southern blotting.

15 Une sonde nucléotidique constituée par le marquage au ^{32}P de la SEQ ID n°5 est incubée avec cette membrane de transfert.

Après autoradiographie, la présence de bande(s) réactive(s) permet de diagnostiquer la présence de
20 *Neisseria meningitidis* dans l'échantillon.

Exemple 4 : Composition vaccinale incluant dans son spectre une prophylaxie à visée anti-méningococcique et destinée à prévenir toute forme d'infection par *Neisseria meningitidis*.

25

Le polypeptide encodé par la SEQ ID n°10 est conjugué à une toxine.

Ce polypeptide conjugué est alors ajouté à une
30 composition comportant le vaccin anti-*Haemophilus* et anti-pneumocoque, ou tout autre vaccin de l'enfance.

La composition résultante peut, après avoir été rendue stérile, être injectée par voie parentérale, sous-cutanée ou intramusculaire.

Cette même composition peut également être
5 pulvérisée au niveau des muqueuses à l'aide d'un spray.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I.N.S.E.R.M
- (B) RUE: 101, rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS CEDEX 13
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L' INVENTION: ADN spécifiques des bactéries de l'espèce *Neisseria meningitidis*, leurs procédés d'obtention et leurs applications biologiques.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 35

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 257 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GATCCGCTGC CGGCAGACGA ATATCAAGAC ATCTTCGATT TTATGAAACA GTATGACTTG	60
TCTTACCCGT ATGAATATCT GCAGGATTGG ATAGATTACT ATACGTTCAA AACCGATAAG	120
CTGGTATTTG GTAACGCGAA GCGAGAGTGA GCCGTAAAC TCTGAGCTCC TGTTTTATAG	180
ATTACAACCT TAGGCCGTCT TAAAGCTGAA AGATTTTCGA AAGCTATAAA TTGAAGCCCT	240
TCCACAGTAC ATAGATC	257

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 276 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

GATCATGTTC AAATAGATAG GCATGGGAAG CTGCAGCTCT AACGTCCATG AAAATATGTT      60
GCATAGCTGC AAGCGGAACG CCTTTTCTTT CATCTACATA ATCTATAGAG TCAAGGCAAC      120
CGCTATTGAA ATTAGCAGTA TTGCCTATGA TTACATTAGT AATATGCTCA TACCATTTTT      180
GGGTGGTCAT CATATTGTGC CCCATTGTTA TCTCCTTATA TTGGTTTGTAG AAGGAACTTT      240
GACAGGAAGA ATAACGGCCT TACCTGTTTG ACGATC                                276

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 428 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```

GATCTGGTGG TGTTTGACAC GGTAGGCGCA TACTTGTTTCG GGAAGTGTAGT TGCGGCGGAT      60
AAGGGTGTCT ATGTGCTGAA TCAGCTGCGA ATCGAGCTTA TAGGGTTGTC GCTTACGCTG      120
TTTGATAGTC CGGCTTTGCC GCTGGGCTTT TTCGGCGCTG TATTGCTGCC CTTGGGTGCG      180
GTGCCGTCTG ATTCGCGGC TGATGGTGCT TTTGTGGCGG TTAAGCTGTT TGGCGATTTT      240

```


GGTGACGGTG CAGTGGCGGG ACAGGTATTG GATGTGGTAT CGTTCGCCTT GGGTCAGTTG 300
 CGTGTAGCTC ATGGCAATCT TTCTTGCAAG AAAGGCCGTA TGCTACCGCA TACTGGCCTT 360
 TTTCTGTTAG GGAAAGTTGC ACTTCAAATG CGAATCCGCC GACCTCTTTC AGTTACAGCA 420
 GCTTGATC 428

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 390 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GATCCTGCAT TGACATCGGC CTTGGCTGTC AGGGTATTGT GACCGGTAAA GTCGGCATT 60
 CCGTTGGCCA ATAAGGATAC ATGACCGTCT GCAGAAACAG CATGAAGGCC GTCTGAAACG 120
 ATATTGCCCT GCAATGCGGT GGTTCGAGA GCCTTGGCTG CGTTCAGCTT GGTATTGCGA 180
 AGCTGAATAT TGCCTTTGGC TGCCTGAATG TGCAGATTAC CCGAGTTGGT ACGCAGATTG 240
 GTATTGGTAA CATTGAGCAA GCCTGCCTCC ACACCCATGT CTTTGTAGGC AGTGAGGGTT 300
 TTAAGTGGTGC CGGTAATATG GGCAGCGTTA TCCGATTTC AATGGATGCT GGCCGGCAGA 360
 CAAATCTTTA TCAACATTCA AATTCAGATC 390

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 177 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GATCAGATTG GTGAAGACGG TATTACCGTC AATGTTGCAG GCCGTTCTGGG ATATACGGCG 60
 AAAATCGACG TGTCTCCGAG TACCGATTG GCGGTTTATG GCCATATTGA AGTTGTACGG 120
 GGTGCAACGG GGTGACCCA ATCCAATTCA GAGCCGGGTG GAACCGTCAA TTTGATC 177

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 341 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GATCAATGAT GCTACTATTC AAGCGGGCAG TTCCGTGTAC AGCTCCACCA AAGGCGATAC 60
 TGAATTGGGT GAAAATACCC GTATTATTGC TGAAAACGTA ACCGTATTAT CTAACGGTAG 120
 TATTGGCAGT GCTGCTGTAA TTGAGGCTAA AGACACTGCA CACATTGAAT CGGGCAAACC 180
 GCTTTCTTTA GAAACCTCGA CCGTTGCCTC CAACATCCGT TTGAACAACG GTAACATTAA 240
 AGGCGGAAAG CAGCTTGCTT TACTGGCAGA CGATAACATT ACTGCCAAAA CTACCAATCT 300
 GAATACTCCC GGCAATCTGT ATGTTCATAC AGGTAAAGAT C 341

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 164 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCCAAC	TTTGATT	TTTA	CTGGCT	GCTT	CTCCAT	GCGC	GGTATT	GACC	AAAGCC	GCAA	60	
GGATATT	TCGC	TTCCAG	ATTG	TCTTTC	CAGG	TGCCGC	CGTT	GACAGC	GGTA	TTAATC	AGTG	20
CGGCACT	GCC	CGCATT	GCT	AGGTTG	ACGG	TCAGGT	TGTT	GATC			164	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 219 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GATCAAT	CAC	ACATCT	TGTC	ATTTTT	TCGA	TTCCTT	CATT	TCGGTT	TCTA	ATGTTT	CAAT	60
TCTTGCG	GCC	ATTCCT	GAA	TGGCTT	TAGT	CAAACG	GGG	ATGAAC	GCTT	CGTATT	CGAC	120
GGTGTA	GGTA	TCGTTT	GTTT	TATTTA	CCAT	CGGCAAT	CGA	CCATATT	CAT	CTTCCAG	CGC	180
AGCAAT	GTCC	TGGGCA	AATA	ACCAAT	GCCG	CAACCG	ATC					219

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 356 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

```

GATCTTGGGT AAGCCCCCAA CCTGCATAGA AAGGCAGGCC GTAGCAGCTG ACTTTTTTGC      60
CGCGCAACAA GGCTTCAAAA CCGGTCAGCG AAGTCATGGT ATGTATTTTCG TCTGCGTATT    120
GGAGACAGGT CAGGATGTCG GCTTGTTTCGG CGGTTTGGTC GGCATATCGT GCAGCATCAT    180
CAGGGGAAAT ATGGCCGATG CGGTTACCGC TGA CTACATC GGGATGCGGT TTGTAGATGA    240
TATAGGCATT GGGGTTTCGT TCGCGTACGG TACGGAGCAA ATCCAGATTG CGGTAGATTT    300
GGGGCGAACC GTAGCGGATA GACGCATCAT CTTCAACCTG GCCGGGAACG AGGATC      356

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 210 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

```

GATCCGCTTT CAGTTTCCGT ACCGGTGGCA TCAGTCAAGT CCGTTTTGTG CACCAAACCG      60
CGTCCATATG AAACATAAAA CAAATCGCTT AAGCCCAAAG GGTTATCGAA CGATAAAGCG    120
ACATTTCTTT GATATTTGCC GGTCTTTTTG CCGCCCGCAT CATCTATACC GATACTGAAC    180
CGTATGGGTT TATTCTGCTG CCATTTGATC      210

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 259 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GATCCCGAAA CGCAATTGGT CGAAAGCTAT ATGCTGAACG ATGTGTTGCG GTTTTGGGAC 60
 AGCGCAGGTT TGGGCGATGG GAAAGAAGCC GACCGCGCCC ATCGGCAAAA ACTGATTGAT 120
 GTCCTGTCTA AAACCTATAC TCATTCCGAT GGGCAGTGGG GCTGGATAGA TTTGGTGTTC 180
 GTTATCCTTG ACGGCAGCTC CCGCGATTG GGTACGGCCT ATGATTTGTT GAGGGATGTT 240
 ATCCTTAAAA TGATTGATC 259

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 436 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GATCAAATGG ATGATTTATA TAGAATTTTC TTTTACGACT GCGTGCCGTT TGAAAAGAAA 60
 ATGCACAATC CCGTATCTCA TCGTGCCATA GATTTTTTCAA AGACTCCGGA AGCCATATTT 120
 CGTTGCAATC TGCATACCGA ATTGAAGAAG AAGCGTAAAT TAGCGTTACG TTTAGGCAAG 180
 CTGTCGGACA ATACAGCATG GATATTAAAA CCCCAAGTCA TGAAAAATCT TCTGAAAAAC 240
 CCGTCAACTC AAATTACGGA AAACGATGTC GTGCTCGATG TTAAACAAAA AGGTGTAGAT 300
 ATGCGTATAG GCTTGATAT TTCATCTATT ACCTTAAAAA AACAAGCCGA TAAATCATC 360
 TTGTTTTCTG GTGATTCCGA TTTTGTCCCA GCAGCCAAAT TAGCCAGACG GGAAGGTATC 420
 GATTTTATTC TTGATC 436

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 363 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GATCGTTTTTA	CGTCGCAATC	GAGCTTTGTG	GTGCGCTCGC	CTAAAAGCCA	ATCTTCTCTC	60
AATGGCCTGG	GTGCCATTTT	GCAGGGCACA	GGTTTTGCCC	GTGCGCAAGA	CGATATTTAT	120
ACCGTGCAGG	AATATATGCA	GTCGCGTTCG	GCTTTGGATG	CGTTGCGTAA	GAAAATGCCC	180
ATTCGCGATT	TTTATGAAAA	AGAAGGCGAT	ATTTTCAGCC	GTTTTAATGG	TTTTGGCCTG	240
CGTGGCGAGG	ATGAGGCGTT	TTATCAATAC	TACCGTGATA	AGGTATCCAT	CCATTTTGAC	300
TCTGTCTCAG	GCATTTCCAA	TTTGAGCGTT	ACATCGTTTA	ATGCCGGTGA	ATCTCAAAG	360
ATC						363

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 314 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*

(B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GATCTTGCGT	CATTTATATC	TTCACCGATA	TTGCAATTAC	CGCCGTTCCA	GTTGAAAATAA	60
CAACGACTAA	AATTGTAGTT	CCTAAAAGAA	TCATTCCCTAT	TCTTGCGTAC	CATTTCCTCAA	120
TAATTGCGCC	CGACAATTTC	CATTTAATGC	TCCATCAGTT	CTTTTACTTC	CGGAAATCTG	180
CTGTAATCTG	ACATAAGACG	CATAATTGAA	CTATCAACGC	CGTAACAGCC	ATAGGTTTTTA	240
ATACCGTTTT	CGGCGTGTTT	CCAAATGCAA	TACTGTATT	CGTAGCCTTT	TACAAATTTA	300
TCGGTTTCGG	GATC					314

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 256 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

```

GATCATACGA ATCTACCTTA AAATACCCCG TCGCCGATTT AGGATTGGCT ACATAAAGCT      60
CATTATAAGG GTATTTTGAT GACATGATAC GGTAAATTC ATTGCCGTTG TTTATCCTGA      120
TTCTATAAAT TGGTTCAACA GCAAAGCCTC TGGATTCCCT TAATTGATTA TAATATTGCC      180
TGTATGTTTG TACATCATGT CTTGTCCACG GCTCTCCAGG AGTCCTCAGA ATAGCAATCC      240
CGTTAAATTT CGGATC                                                    256

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 235 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

```

GATCCACGCC TGTGCCTACC TTGGCTTTTT GTTCGCCAAA CAAGGCATTT AAGGTTGAGG      60
ACTTGCCGAC ACCTGTCGCA CCGACAAGCA AGACATCCAA ATGACGGAAA CCGGCTGCTG      120
TGACTTTTTG CCCGATTTCA GAAATACGGT AACGATGCAT ATGCGCTCCT ACCAGCCAAA      180
AAAAGAAGCA ACCGTGCTAA TCGCCCCTCC AATCGCTTTT GCAGCACCGC CGATC          235

```


(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 259 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

```

GATCCAACGG GCATCGCTGT CCTTACTCGG TGTGGTTTGA CCGCTGATTT GTCCTTCTTC      60
GTCAACTTCT ATGGCCTGAC GCTGTTTGCT GCCGGCGGTC TGGATAATGG TGGCATCAAC      120
GACGGCGGCG GATGCTTCT CTATTTTCTAG GCCTTTTCTCG GTCAGTTGGC AGTTAATCAG      180
TTTGAGTAAT TCGGACAGGG TGTCGTCTTG CGCCAGCCAG TTGCGGTAGC GGCATAAGGT      240
ACTGTAATCG GGGATGATC                                     259

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 201 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

```

GATCTGTGCC GTTGATTTTA TCTTTCAGAT GCAGCATCGA ATATCGGAAA GCCAAATCAG      60
CAATTCTTTT TGCATCGTGT GGATTTTGAG ACGGGCCTAA TGACCGTACC CGCTTAATAA      120
AAAATGCACC GTCAATCAAA ATGGCGGTTT TCATATTGCT TCCCCTATAT TTGTCAAAGA      180
TATAAAAAAG CCCTTGGGAT C                                     201

```


(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 334 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

```

AATTCAAAGG AGGCATTTGT TGCAAGAAAA GTACAAAGTG ATTTGCAAAA AGCATTGAAT      60
GCTAGCAACT ATAACAAGCA GCAATATGCA AGACGTGCGG CAACAGCGTT AGAGAATGCT      120
TCAAAATCAA AAGTTATGGC AGCGAATTCT TTTTGATCTA TCTTGTGCGA ACGGGTCAAA      180
TATTCTTCGT ACATTGAGTT AATCGTACCA ATCGCCCTAA CCACATTTTC ATCAGAAAAT      240
ATGGAAATAA TAGCATCCCT ATACGCACCT AGTGTAAATAT TGTTTCTATT ATTAGTTATA      300
GCATTATTCG AATACATAAT AGCACCTCCA AATT                                     334

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 238 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

```

AATTCCTGCG CACCTTTGCC GATGGGGAGA TAATCGCCTT TTTGCAGCAT TCTGCCCTGA      60
TGGCCGCCGA AACCGGCTTT CAGGTCGGTA CTTCTCGAAC CCATCACTTC CGGCACATCA      120
AATCCGCCCCG CCACGCACAC ATAGCCGTAC ATGCCCTGCA CGGCACGCAC CAGTTTCAAG      180
GTCTGCCCTT TGCGGGCGGT ATAACGCCAA TACGAATAGA CCGGTTGCGC GTCCAATT      238

```


(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- (A) LONGUEUR: 249 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)**(vi) ORIGINE:**

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

```

AATTGGGCGA GATGCTGCCG GAAACGGATT TAAAACAGAT TCGGCGGCA GTGTTGAAGA      60
CGAACGATGA GCGGGCATTG CAGAAGGTGG TGAAAACGGC CAAAGGCAAT GCGCGGAAAC      120
TGTCGAAGCT GCTGCTGATT GTGGACTATT TGTTGCAGGT TAACCCTGAT GTTGATTTGG      180
ATGATGATGT AATCGAACAC GCGGAAACCT ATTTAATCCA CTAAACCTTT GACAGATAAG      240
GCAATAATT                                     249

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

- (A) LONGUEUR: 212 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)**(vi) ORIGINE:**

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

```

AATTTATGTA CGGTTTTGCC GTTTGCAGTC AGCCAGTCGG CAAGGCGCAG AAAAAAATCG      60
CCGACAGGGC CTTGAAGCAG CAGGATATTT TCTGCGCTTT CAAGCAGGTT TTGCAGGTTA      120
TTTTTGAGGA CGGTCTGTTT CATGTTGCAA TGTGGTTTTG TTTTATATGT AATAGTTTTA      180
GGTTGAACTT TCAAGCATAC GCCAAGAGAA TT                                     212

```


(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 227 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
 - (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

```

AATTCAGTGC CTGCGTCATA TCACGGCTAC CTTGTGGTTC AGGGTTACTG TATCGCCCGC      60
GGCATCGACG GCTTCAATAT GCAGCTTCAG CCAGCCGTGC TGCGGGGCGG ATGCGGTTAC      120
TTGGATGGAT TGGGCGCGTT TGGACTGAAT CACGGGCTGC AAGGCTTGCT CGGCGTACTG      180
TTTGGCCAGT ACTTCGATGC GCTTTAAATG CTTTGGCGG CGCAATT                      227

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 167 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
 - (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

```

GATCCAGGAC TCAAAAACCG ATTCCTAAT AGAGTGCTA ATATCCCAAT CTTTTTTACC      60
CCCTCTGCTG TAGAATTGAT AGAGAAAGTT TGTCTATCTT TTTCATATAC CCATGCCTTC      120
TTTTTATCAT TGTAGCTAAC ATAACGCCA AACAATGCTT CTAGATC                      167

```


AATTCTTGCG	GCCATTTCCT	GAATGGCTTT	AGTCAAAACG	GGGATGAACG	TTTCGTATTC	60
GACGGTGTAG	GTATCGTTTG	TTTTATTTAC	CATCGGCAAT	CGACCATATT	CATCTTCCAG	120
CGCAGCAATG	TCCTGGGCAA	TAAACCAATG	CCGCAACCGA	TCTTCTTTAT	GACTGCCGTC	180
CTTGATTGGA	TTCGCCCACC	ATTCGCGGAC	TTTGTCCGCT	CGTTCATCTG	CCGGCAAGTC	240
TTTGAATAAT	T					251

AATTCCCGAC	TATCGCGGAT	GCGTAGTTTT	TGCCGGTGGG	CAAGAGCAGG	TGTGGGATAA	60
GTTAGGTGAT	TTGCCCCGATG	GCGTCAGCCT	GACCCCGCCT	GAATCGGTAA	ATATTGACGG	120
CTTAAATCC	GTAAAACTCG	TCGCATTAAA	TGCTGCCGCT	CAGGCTTTTA	TTAACAAGCA	180
CGCCGGTATC	GACAGCGTAC	CTGAATT				207

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 379 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

```

AATTGTTTGG GAATAATCCA AACAAACAGC ATCAGGATAG CGGCGGCGGT CAGGCTGCCT      60
GAAAGGATTT TGCCGGGGTT TTTTGTAGGC AAAGCGGACG AGAAACCAA GCAACAGCAG      120
CATGGTGTCC CAATAGCCGA TTGAGAATAG GATGGCCAAA CCTTCTAGGA AATGGCGTAA      180
ATCGTTTGTG GTAACCATGG GTAGTTCCTG TGGTTAAATG TGCAGGCTGC TTTTGGCCGA      240
ACCTTGCCGC ATCTCAAAG CAGCCTGCGC TTCAGCGTTG CGTTACGCAG TAAATAATG      300
AATATTTGTA ACGGCTTGGG TATTTTTTGT CAATATTCCC GCCCTTCCT TAACAGCTGC      360
CGCGCTTTC GTTAAAT
                                                                                   379

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 274 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Neisseria meningitidis*
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

```

AATTCGCCGA AATCAGGCTG CTGCTCGATA ATCGGCGCGG CCGATTGGCG TTGTGCCTCG      60
ATTAAATCCA TCTTGTCTTG CAGACGTTTG GCCTGGCCTT TCGGCGGCG TTCGGCCAGT      120

```


TGTTCCATCC GCGTTTCCGC AAATGCCGCC CGTTTGTTCG CGTTGAATAC CGCTTTGCAA 180
 ATCACCTTGC CCTGCATATC CTTCAACAATC ACATGGTCGG CATCGTGGAT GTCGTAAGCC 240
 ACCCGTACCT TCTGACCGCT GTAATCCAGC AATT 274

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 263 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

AATTCCGTTT TTATTGGGCT TTTTCCATCC ATCGGGTATG CCTGAAGGGA ACGCAAACCC 60
 TGCCACTTGC CCATCGCTCC ATTCCCGCAT TAGCGCGTCT GACGGCAAGT GTTCTCGCGC 120
 CCAATCAAGC CACGCCTGCC GCATTGCGGC CTTGTCTTGC TGAAAACTTC GCAGTGCTTT 180
 TGCAACCGGC CCATCATTA CTTCAATCAA ATAAATCATT ATATTGCGT TCATTTTTCC 240
 TACACCTTCG CCACATCCAA ATT 263

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 316 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

AATTGTTCAA GAAAAAAGTC GGCACGGCGC GGCAACGGGG AAAATGCGTT GACGCCGTCT 60
 TTTTCTAAGG TGATGTAGTA GGGGCGGAAA TAGCCTTCTT CAAACGCCCA GAACTGGCT 120

TGGTTTTTCGT TTGCAATGCG TTTTGCAATG ACGTGATAAG GCGGTGTGTC GCCAAAGCAG—180
 ACAACGGCCT GGATGTGATG TTGAGTGATG TATTCTTGCA AAAACTCAGG AAAGGCGTCG 240
 TAGTTGTCGT TAAAAACAAC GGTATGCGCT TGAGTGGGCG GATAAAAATA GTCGTCGCCT 300
 GCATTAAAGT TGAATT 316

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 324 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
 - (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

AATTCAATCA ACGGAAAACA CATCAGCATC AAAACAACG GTGGTAATGC CGACTTAAAA 60
 AACCTTAACG TCCATGCCAA AAGCGGGGCA TTGAACATTC ATTCCGACCG GGCATTGAGC 120
 ATAGAAAATA CCAAGCTGGA GTCTACCCAT AATACGCATC TTAATGCACA ACACGAGCGG 180
 GTAACGCTCA ACCAAGTAGA TGCCTACGCA CACCGTCATC TAAGCATTAC CGGCAGCCAG 240
 ATTTGGCAAA ACGACAAACT GCCTTCTGCC ACAAGCTGG TGGCTAACGG TGTATTGGCA 300
 CTCAATGCGC GCTATTCCCA AATT 324

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 230 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
 - (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

AATTATGCAA AAAACGCAA CGCCGAAAA CTGGCACCGC GCGGATATTG TTGCTGCTTT	60
GAAAAAGAAA GGCTGGTCAC TTCGAGCACT TTCAATAGAA GCGGGGTTGT CGCCGAATAC	120
GCTTAGAAGC GCACTGGCCG CCCCTTATCT TAAGGGAGAA AGGATTATTG CCGCTGCAAT	180
CGGAGTGGAA CCGGAAGAGA TTTGGTCCGA ACGGTATGCA GATCGGAATT	230

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 249 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

AATTTAATCG GTGGAATGCC TGTTCAACCG CACCAATCCC GCTGAATACG GTTGCTAATC	60
TAATATGTGA ATCAGGTTTA AGAAAAGTTT TAGATTTCCT ACCTTGTTGA CTGGGAAAGA	120
GCAAAGTTTT TTGTAATCGA GTATCGTGTG TCTGTGCCAT TGTCGAAATA GTCATACTTA	180
TATCGTTCTG TTTATCTTAT CAATATGAAA ACTACATCGT TGATTGCCCT GACAATGCCT	240
TGGTCAATT	249

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 343 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: Z2491

AATTCTTGTC	CCGGAGTCCA	ACGTATATTT	ACCCTCCTGC	GAGCTAAAAG	ACTATTATTC	60
TCCACTGCCA	CAGTAGCCGC	ATTCAACGCC	GTATTACAT	CCCCTTTAAC	CAATGCCACT	120
GCGCTGCCTG	CGATAATCTG	CGAGTAGGCT	ATGACTTTTT	GGCGTTCTTG	GGGTGACAGT	180
TTGCCTACAT	CGCGTCCGTC	CAACAGGGTT	TCTCCCACCA	TCTCGCCGAC	TGCCGCGCCG	240
ATTGCGCCGT	CCCGACATTT	GCCTTTATTT	GCTACCGCCG	ATGCACAGCC	TGCTACGGCA	300
TGGGCTATCT	TGTGGGCAAT	GTAGTCTTCG	CTGAGATTAA	ATT		343

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
(B) SOUCHE: Z2491

AATTCCTTCAA	ACATCGTTTC	GATAATCGGG	TCGGTGTACA	CACTGATGCG	GTCGCCC	GCA	60
CGGCTTTGAC	CGGCTCGGAA	AATATAGGCG	GTGGCTTTGC	CGTCGGCGAT	GTCGACGCAC		120
CAACGCCAGA	TGGCGTCTTC	GGTATTCAA	CAATCACCCG	CACAGCTTTC	ACCTGCGCGG		180
AATT							184

REVENDECATIONS

1/ ADN caractérisés en ce qu'ils sont présents chez *Neisseria meningitidis* (désignée ci-après par Nm) et absents chez *Neisseria gonorrhoeae* (désignée ci-après par Ng), à l'exception des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule polysaccharidique, *frpA*, *frpC*, *opc*, *porA*, et rotamase.

2/ ADN selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent une ou plusieurs séquence(s) telle(s) que présente(s) sur le chromosome de Nm Z2491 entre *tufA* et *pilT*, ou région 1 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) nucléotidique(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou lesdites séquences.

3/ ADN selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent une ou plusieurs séquence(s) telle(s) que présente(s) sur le chromosome de Nm Z2491 entre *pilQ* et λ 740, ou région 2 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) nucléotidique(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou lesdites séquences.

4/ ADN selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent une ou plusieurs séquence(s) telle(s) que présente(s) sur le chromosome de Nm Z2491 entre *argF* et *opaB*, ou région 3 du chromosome, et/ou la ou les séquence(s) capable(s) de s'hybrider avec la ou lesdites séquences.

5/ ADN selon la revendication 2, caractérisés en ce que leur séquence correspond, pour tout ou partie, à SEQ ID n° 9, 13, 22 ou 30, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou est capable de

s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

5 6/ ADN selon la revendication 3, caractérisés en ce que leur séquence correspond pour, tout ou partie, à SEQ ID n° 1, 2, 4, 6, 7, 10, 15, 31 ou 34, et/ou, à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou est capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une
10 quelconque de ces séquences.

 7/ ADN selon la revendication 4, caractérisés en ce que leur séquence correspond, pour tout ou partie, à SEQ ID n° 8, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 32 ou 35, et/ou, à
15 toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm, et/ou est capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

20 8/ ADN selon la revendication 1, caractérisés en ce que leur séquence correspond, pour tout ou partie, à SEQ ID n° 3, 5, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 27 ou 33, et/ou à toute séquence se situant à plus ou moins 20 kb de ces SEQ ID sur le chromosome d'une souche de Nm,
25 et/ou, est capable de s'hybrider avec au moins un fragment de l'une quelconque de ces séquences.

 9/ ADN selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il code
30 pour une protéine exportée au-delà de la membrane cytoplasmique.

 10/ ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisés en ce que tout ou

partie de leur séquence correspond à une région conservée au sein de l'espèce Nm.

5 11/ ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est inséré dans un vecteur de transfert ou d'expression tel que cosmide, plasmide ou bactériophage.

10 12/ Cellule hôte, plus particulièrement cellule bactérienne ou cellule de Nm, transformée par l'insertion d'au moins un ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

15 13/Cellule comportant des gènes ou des fragments de gènes spécifiques de Nm, plus particulièrement cellule bactérienne, ou cellule de Nm, dont le chromosome est délété d'au moins un ADN selon l'une quelconque des revendications 1-11, en particulier d'un ADN responsable de la pathogénicité.

20 14/ ARN, caractérisés en ce que leur séquence correspond pour tout ou partie à la transcription d'au moins une séquence ou fragment de séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

25 15/ Acides nucléiques anti-sens, caractérisés en ce que leur séquence correspond à l'anti-sens d'au moins une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1-11,13, ou d'un fragment d'une telle
30 séquence, et qu'ils portent, le cas échéant, au moins une substitution chimique telle qu'un groupe méthyle et/ou un groupe glycosyle.

35 16/ Polypeptides, caractérisés en ce qu'ils présentent un enchaînement d'acides aminés correspondant

à tout ou partie d'une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou 13, ou tel que déduit des séquences de ces acides nucléiques, avec, le cas échéant, des modifications par rapport aux séquences codées ou déduites dès lors que ces modifications n'altèrent pas les propriétés biochimiques telles qu'observées chez le polypeptide natif.

10 17/ Polypeptides selon la revendication 16, caractérisés en ce qu'il s'agit de tout ou partie de polypeptides exportés au-delà de la membrane cytoplasmique, plus spécialement de polypeptides correspondant à tout ou partie de ceux encodés par un ADN
15 selon la revendication 10.

18/ Anticorps, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre au moins un épitope d'un polypeptide selon la revendication
20 16 ou 17, ou de fragments de ces anticorps, plus particulièrement les fragments Fv, Fab, Fab'2, ou encore d'anti-anticorps capables de reconnaître, selon une réaction de type antigène-anticorps, lesdits anticorps ou leurs fragments.

25 19/ Procédé d'obtention de banques d'ADN *Neisseria meningitidis*-spécifiques, comprenant les étapes de :

- de mélange de deux populations d'ADN
30 provenant respectivement d'une souche de *Neisseria meningitidis*, ou souche de référence, pour laquelle la banque spécifique doit être constituée, et d'une souche de *Neisseria gonorrhoeae*, ou souche de soustraction, les

séquences d'ADN de ces souches étant telles qu'obtenues par

5 . cisaillement aléatoire de l'ADN de la souche de soustraction, notamment par passages répétés à travers une seringue, et

. clivage de l'ADN de la souche de référence, de préférence par une enzyme de restriction produisant des fragments de taille inférieure à 1kb environ,

10 20/ Banques de clones d'ADN telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 19.

21/ Application du procédé selon la revendication 19 pour l'obtention de banques d'ADN
15 spécifiques d'une cellule donnée ou d'un variant donné d'une même espèce de cellule, dès lors qu'il existe une autre espèce ou un autre variant proche génomiquement, et exprimant des pouvoirs pathogènes différents, en particulier de banques d'ADN spécifiques de cryptocoques,
20 d'*Haemophilus*, de pneumocoques ou encore d'*Escherichia*.

22/ Méthode de diagnostic d'une infection méningococcique, et plus particulièrement de la méningite méningococcique, par mise en évidence de la présence de
25 *Neisseria meningitidis* dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique à analyser, avec un réactif élaboré à partir d'au moins un acide nucléique tel que défini dans l'une des
30 revendications 1 à 11, ou 13, le cas échéant sous forme de sonde nucléotidique, ou d'amorce, ou en variante à partir d'au moins un anticorps, ou un fragment d'anticorps, tel que défini dans la revendication 18,

dans des conditions permettant respectivement une hybridation ou une réaction de type antigène-anticorps, et

- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

23/ Méthode de diagnostic d'une réaction immunitaire spécifique de l'infection méningococcique, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique à analyser avec au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17 ou d'un anti-anticorps selon la revendication 18, ou d'un fragment de celui-ci, ces produits étant, le cas échéant, marqués dans des conditions permettant la réalisation d'une réaction de type antigène-anticorps, et
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

24/ Kits pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, caractérisés en ce qu'ils comportent :

- au moins un réactif tel que défini dans la revendication 22 ou 23, à savoir de type acide nucléique, anticorps ou polypeptide,
- les produits, notamment marqueurs ou tampons, permettant la réalisation de la réaction d'hybridation nucléotidique ou de la réaction immunologique visée, ainsi qu'une notice d'utilisation.

25/ Composition vaccinale incluant dans son spectre, en particulier en association avec au moins un vaccin pour l'enfance, une prophylaxie à visée anti-

méningococcique, et destinée à prévenir toute forme d'infection par *Neisseria meningitidis*, caractérisée en ce qu'elle comprend, en association avec un/des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace :

5

- de polypeptide selon la revendication 16 ou 17, ou

- d'anticorps ou de fragment d'anti-anticorps selon la revendication 18,

10

ce matériel étant éventuellement conjugué, afin de renforcer son immunogénicité, à une molécule porteuse telle que protéine de polyovirus, toxine tétanique, protéine issue de la région hypervariable d'une piline.

15

26/ Composition vaccinale incluant dans son spectre, en particulier en association avec au moins un vaccin pour l'enfance, une prophylaxie à visée anti-méningococcique, et destinée à prévenir toute forme d'infection par *Neisseria meningitidis*, caractérisée en ce qu'elle comprend, en association avec un/des véhicule(s) physiologiquement acceptable(s), une quantité efficace :

20

- d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou 14, ou

25

- de cellules selon la revendication 12 ou 13.

partie de leur séquence correspond à une région conservée au sein de l'espèce Nm.

5 11/ ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est inséré dans un vecteur de transfert ou d'expression tel que cosmide, plasmide ou bactériophage.

10 12/ Cellule hôte, plus particulièrement cellule bactérienne ou cellule de Nm, transformée par l'insertion d'au moins un ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

15 13/Cellule comportant des gènes ou des fragments de gènes spécifiques de Nm, plus particulièrement cellule bactérienne, ou cellule de Nm, dont le chromosome est délété d'au moins un ADN selon l'une quelconque des revendications 1-11, en particulier d'un ADN responsable de la pathogénicité.

20 14/ ARN, caractérisés en ce que leur séquence correspond pour tout ou partie à la transcription d'au moins une séquence ou fragment de séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

25 15/ Acides nucléiques anti-sens, caractérisés en ce que leur séquence correspond à l'anti-sens d'au moins une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1-11,14, ou d'un fragment d'une telle
30 séquence, et qu'ils portent, le cas échéant, au moins une substitution chimique telle qu'un groupe méthyle et/ou un groupe glycosyle.

35 16/ Polypeptides, caractérisés en ce qu'ils présentent un enchaînement d'acides aminés correspondant

à tout ou partie d'une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou 14, ou tel que déduit des séquences de ces acides nucléiques, avec, le cas échéant, des modifications par rapport aux séquences codées ou déduites dès lors que ces modifications n'altèrent pas les propriétés biochimiques telles qu'observées chez le polypeptide natif.

10 17/ Polypeptides selon la revendication 16, caractérisés en ce qu'il s'agit de tout ou partie de polypeptides exportés au-delà de la membrane cytoplasmique, plus spécialement de polypeptides correspondant à tout ou partie de ceux encodés par un ADN
15 selon la revendication 10.

18/ Anticorps, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre au moins un épitope d'un polypeptide selon la revendication
20 16 ou 17, ou de fragments de ces anticorps, plus particulièrement les fragments Fv, Fab, Fab'2, ou encore d'anti-anticorps capables de reconnaître, selon une réaction de type antigène-anticorps, lesdits anticorps ou leurs fragments.

25 19/ Procédé d'obtention de banques d'ADN *Neisseria meningitidis*-spécifiques, comprenant les étapes de :

- de mélange de deux populations d'ADN
30 provenant respectivement d'une souche de *Neisseria meningitidis*, ou souche de référence, pour laquelle la banque spécifique doit être constituée, et d'une souche de *Neisseria gonorrhoeae*, ou souche de soustraction, les

séquences d'ADN de ces souches étant telles qu'obtenues par

5 . cisaillement aléatoire de l'ADN de la souche de soustraction, notamment par passages répétés à travers une seringue, et

. clivage de l'ADN de la souche de référence, de préférence par une enzyme de restriction produisant des fragments de taille inférieure à 1kb environ,

10 20/ Banques de clones d'ADN telles qu'obtenues par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 19.

15 21/ Application du procédé selon la revendication 19 pour l'obtention de banques d'ADN spécifiques d'une cellule donnée ou d'un variant donné d'une même espèce de cellule, dès lors qu'il existe une autre espèce ou un autre variant proche génomiquement, et exprimant des pouvoirs pathogènes différents, en particulier de banques d'ADN spécifiques de cryptocoques, 20 d'*Haemophilus*, de pneumocoques ou encore d'*Escherichia*.

22/ Méthode de diagnostic d'une infection méningococcique, et plus particulièrement de la méningite méningococcique, par mise en évidence de la présence de 25 *Neisseria meningitidis* dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique à analyser, avec un réactif élaboré à partir d'au moins un acide nucléique tel que défini dans l'une des 30 revendications 1 à 11, ou 14, le cas échéant sous forme de sonde nucléotidique, ou d'amorce, ou en variante à partir d'au moins un anticorps, ou un fragment d'anticorps, tel que défini dans la revendication 18,